

I. Généralités-historique

Qu'est-ce que la microbiologie ? C'est l'étude des micro-organismes

Qu'est-ce qu'un micro-organisme ? Un organisme observable au microscope

La microbiologie a pris son sens quand on a observé les premiers micro-organismes. Au XVII^e siècle, Antoni Van Leeuwenhoek est le premier à avoir observé des micro-organismes, sous une simple lentille. Il a observé des spermatozoïdes, puis il a observé des spirogyres et des vorticelles.

En même temps que lui, Robert Hooke a élaboré le premier microscope (figure 3.2 page 2 du polycopié), ainsi que le baromètre à roue, le joint universel, le thermomètre à alcool, et il a proposé que le zéro du thermomètre soit le point de fusion de la glace. Il a fait de nombreuses observations très précises de micro-organismes.

Au XVII^e siècle, les micro-organismes n'étaient qu'un objet de curiosité, il a fallu attendre le XIX^e siècle et Pasteur, et ses travaux. Il a travaillé sur la fermentation, conservation du vin et de la bière (pasteurisation), culture pure (un seul type de micro-organisme), et il a aussi travaillé sur la maladie du ver à soie, sur les maladies infectieuses (streptocoque A, streptocoques D (fécaux), staphylocoque (gangrène, staphylococcus aureus), pneumocoque), et sur le Vaccin (cholera du poulet, charbon, rage). C'est lui qui a travaillé en asepsie. Il a travaillé avec un imminent obstétricien, et ils ont fortement diminué la mort des nouveaux nés, en faisant des accouchements aseptiques.

Robert Koch a fait des travaux sur le charbon du mouton : Bacillus anthracis. Il a identifié, cultivé, déterminé le mode de transmission de l'agent infectieux de la Tuberculose : BK ou « bacille de Koch », appelé Mycobacterium tuberculosis. Le réactif est la tuberculine. Il découvre l'agent microbien du cholera : le bacille à virgule.

La Terre a 4,5 Milliards d'années, et les micro-organismes ont 3,5 milliards d'années. L'eau a été apportée par des comètes, l'atmosphère était anoxygénique, mais comportait du méthane, du soufre... A ce moment là on a vu apparaître des acides aminés comme la glycine, l'alanine... On a retrouvé des formes fossilisées de micro-organismes dans des stromatolites. On a retrouvé des bactéries filamenteuses, des cyanobactéries, et on pouvait les trouver en colonies. Les cyanobactéries sont des bactéries photosynthétiques oxygéniques. Elles ont été responsables de la modification atmosphérique de la quantité d'oxygène. Elles vivaient dans des grottes. L'hypothèse a été émise selon laquelle les cyanobactéries seraient à l'origine des Euarthropodes (Voir schéma 1 page 3 du polycopié). Il existe des paramécies tueuses qui ont des particules Kappa, toxiques, qui tuent d'autres paramécies. De la même façon, il existe un protozoaire flagellé qui contient des cyanelles, des cyanobactéries capables de photosynthèse. Les progénotes ont évolué en Prébactéries ou en Préarchæa. La seule différence réside dans la composition de la membrane, les prébactéries contiennent la fonction ester alors que les Préarchæa contiennent des fonctions éther. La première théorie était que les prébactéries étaient les ancêtres des Protoarchæa, mais aujourd'hui, on a conservé l'hypothèse du progénote. Des Eubacteria auraient fusionné avec des Protoarchæa, ce qui aurait donné une pré-eucarya, donnant les eucarya, qui, en fusionnant avec des eubacteria, auraient formé des eucaryotes avec mitochondries qui, en fusionnant encore avec des eubactéries auraient formé les algues avec chloroplaste, et donc les plantes.

Eucaryotes	Procaryotes
Algues unicellulaires ou pluricellulaires	Eubactéries
Protozoaires unicellulaires (paramécie)	Archéobactéries
Mycètes (levure) unicellulaire ou coenocytiques (un cytoplasme avec plusieurs noyaux)	

Distinction entre Eucaryotes et Procaryotes : pas de vrai organite cellulaire. Un organite est un espace délimité par une membrane plasmique, une bicouche lipidique.

Les virus sont, pour certains, considérés comme des micro-organismes, et pour d'autres non, puisqu'ils ne sont pas capables de se reproduire d'eux même. La virologie est l'étude des virus.

Voir tableau B page 5 du polycopié

A. Bactériologie

On compte 500 000 espèces de bactéries. Elles constituent des éléments précieux de recherche (médicales, industrielle). Il faut les classer, les regrouper, et donc former des taxons, basés sur les caractères biochimiques, physiologiques, morphologiques, génétiques, de biologie moléculaire, de génétique moléculaire. On appelle cela la taxonomie/taxinomie ou systématique bactérienne. Elle est divisée en 3 parties :

1. La classification

Voir exemple page 2 du polycopié échanger Domaine et Règne

Certains micro-organismes peuvent changer d'embranchement ou de classe selon l'évolution de la classification. Par exemple, *Diplococcus pneumoniae* est devenu *Streptococcus pneumoniae*. Une **espèce** est un ensemble de bactéries qui vont avoir en commun de nombreuses propriétés stables, qu'elles soient phénotypiques ou génotypiques. Le **phénotype** est l'ensemble des caractères visibles dépendant de l'expression du génome et de l'interaction avec l'environnement. Le **génotype** est le potentiel génétique de la bactérie. Le **clone** est la population bactérienne issue d'une seule bactérie, c'est un seul individu qui a donné toute la population. Parmi ces clones, on assimile la notion de **souche**, par leurs caractères communs. Par exemple, chez E. Coli, certains individus diffèrent par un seul caractère. Si ce caractère est biochimique, on les appellera Biovar. Si ce caractère est morphologique, on les appellera Morphovar. On peut avoir des Morphobiovar. Si ce caractère est antigénique (présence d'antigènes ou non...), on les appellera Sero-var. Si ce caractère est enzymatique, on les appellera Zymovar. Si ce caractère est antibiotique, on les appellera Antibio-var. Si ce caractère est une sensibilité bactériophage, on les appellera Lyso-var.

2. Nomenclature

La nomenclature suit un système binomial latin, écrits en italique, et le nom de Genre est écrit avec une majuscule.

3. Identification

C'est l'aspect pratique de la taxonomie. On verra en TP comment identifier des micro-organismes.

II. La cellule bactérienne

A. Méthode d'étude des bactéries

1. Utilisation de microscope

a) Microscope optique photonique

Faisceau de photons qui traversent l'échantillon pour former l'image. En microbiologie, on va utiliser principalement des objectifs x100, et des oculaires x10. Donc notre grossissement maximal sera x1000. En microbiologie, on utilise aussi bien les microscopes à fond clairs que les microscopes à fond noirs (dans les laboratoires d'analyse médicale), où les organismes apparaissent brillants sur un fond noir. Ce dernier permet l'observation de certaines structures internes. Par exemple, on peut détecter la syphilis.

b) Microscope optique à contraste de phase

On utilise aussi des microscopes à contraste de phase, qui permet d'observer les différences d'indices de réfraction. Cette différence est transformée en différence d'intensité lumineuse, donnant une meilleure image. Ceci permet d'observer des bactéries vivantes.

c) Microscope à fluorescence

Il existe aussi des microscopes à fluorescence. L'image est formée par la lumière émise par l'échantillon.

Le pouvoir de résolution est la plus petite distance visible entre 2 points, c'est la distance minimale pour laquelle deux points sont encore visibles. Pour un microscope optique, elle vaut 0,2 micromètres. A l'œil nu, on distingue jusqu'à 0,2 mm. Un microscope optique ne distingue jamais plus de 0,2 micromètres, donc il ne grossira jamais plus de 1000 fois.

d) Microscope électronique

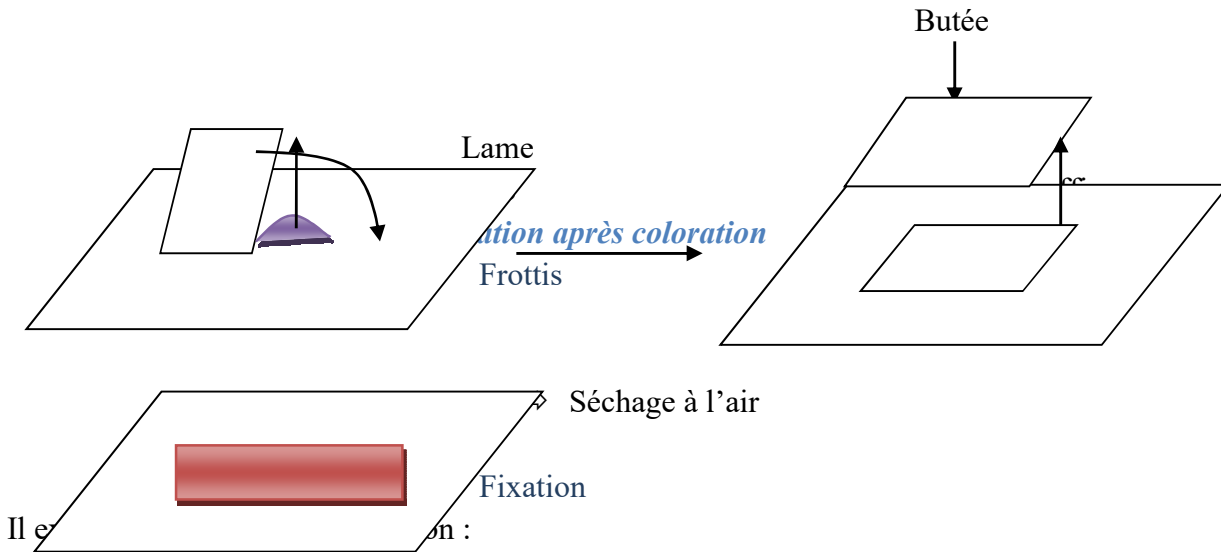
Il est plus puissant, c'est un faisceau d'électrons qui traverse l'échantillon. Le pouvoir de résolution est de 0,5 nm (5 Angström).

2. Préparation de l'échantillon

L'observation diffère suivant le type d'échantillon :

a) Observation directe = Etat frais

Micro-organismes vivants. Montage entre lames et lamelles. On dépose la goutte sur la lame, et on écrase la goutte avec la lamelle. Il faut faire attention de ne pas se couper ou de ne pas casser de lamelle.



- (a) Physique : chaleur
- (b) Chimique :
 - glutaraldéhyde, acétone, alcool
 - Formaraldéhyde

(3) Coloration

On utilise des colorants suivant leur basicité ou leur acidité. Ils mettent en évidence certains constituants, comme le flagelle, la paroi, les spores... En microbiologie, on aura souvent à faire des colorations différentielles.

- (a) Coloration différentielle
- (b) Coloration de Gram
 - (i) Bactéries Gram +
 - (ii) Bactéries Gram -

B. Diversité des micro-organismes

1. La forme des micro-organismes

Il existe des bactéries sphériques appelées coques ou cocci.

2. L'arrangement des micro-organismes

Les coques s'organisent différemment en chaînes courtes ou grandes (streptocoques), seuls (microcoques) ou à deux (diplocoques). Les Staphylocoques forment des formes de grappes de raisin.

Les bacilles peuvent former des Y (pseudo ramifiés, Mycobactéries).

Il existe aussi des formes incurvées ou spiralées, par exemple les leptospires, qui peuvent passer à travers les muqueuses. Les bactéries filamenteuses comme Cytophaga ou Acetomycètes.

Les bactéries pléiomorphes peuvent changer de forme au cours de leur vie. Par exemple, Leucotrix, Caulobacter, Azobacter.

Les bactéries engainées sont contenues dans une gaine, comme Sphaerotilus.

Voir polycopié

Les micro-organismes procaryotes sont plus petits que les eucaryotes : Une amibe fait 300 à 400 micromètres de long, la paramécie a une taille de 150 à 200 micromètres de long. Ce sont des Eucaryotes. Les coques (procaryotes) font 0,5 à 1 micromètres. Les bacilles font 1 à 5 micromètres. Les Mycoplasmes et les Rickettsies font environ 2 micromètres. Les Spirilles font 250 micromètres, et donc la taille ne détermine pas le règne. Une levure 5 micromètres.

Voir page 5 : A et page 2 le schéma avec des bulles

C. Structure bactérienne

1. Matériel génétique

Le matériel génétique n'est pas contenu dans le noyau. Il est apporté par un ADN chromosomique, contenu dans ce qu'on appelle un chromosome bactérien. Chez les bactéries, il n'y a pas de chromosome comme chez les eucaryotes. Le chromosome bactérien est un ADN double brin, qui est parfois circulaire, parce qu'il se rattache en un point à la membrane. C'est le nucléoïde qui contient ce chromosome. Il est constitué à 60% d'ADN. Chez *E. Coli* il fait environ 1,3 mm de long. Elle contient 4000 protéines. On trouve de l'ADN plasmidique dans le plasmide. Il est circulaire, et capable de se répliquer de façon autonome. Plasmide cryptique. Il porte des informations spécifiques, et par exemple le gène de résistance aux antibiotiques, ou les gènes impliqués dans la pathogénicité.

Agrobacterium tumefaciens : responsable de la galle du Colet. Les informations sont portées par un méga plasmide (entoure 1000 kilobases).

Rhizobium meliloti : fixation de l'azote (N_2) de l'eau.

- Transposon

C'est une séquence d'ADN double brin délimité par ce que l'on appelle des séquences inversées répétées. L'intégration est possible soit dans des ADN génomiques, soit dans des plasmides. On peut trouver des gènes de résistance aux antibiotiques Tn3, Tn5 et Tn10.

2. Cytoplasme

80% H_2O , pH = 7,2. Riche en ribosome. Ne contient pas de vrais organites.

- Corps d'inclusion
 - Organiques : réserves d'amidon (glucose chez les végétaux), de glycogène (glucose chez les animaux). Réserves sous forme d'hydroxybutyrate. Ce sont des réserves de carbone. Mais on trouve aussi des réserves d'azote, que l'on trouve chez les cyanobactéries.
 - Inorganiques : Soufre, fer, polyphosphate
- Pseudoorganites : endroit délimité par non pas une bicouche lipidique, mais par une monocouche de lipides. Ils ont des fonctions spécifiques. Par exemple, les chromatophores (cyanobactéries), c'est pourquoi on pense qu'ils sont à la base de la photosynthèse. La Rubisco (carboxylase, contient du ribose) est l'enzyme spécifique de la photosynthèse. Vésicules à gaz permet de remonter à la surface quand elles sont produites.

3. Membrane plasmique

Elle est composée d'une bicouche phospholipidique ([page 2](#)). Le glycérol peut porter sur ses carbones 1 et 2 des acides gras, et sur le carbone 3 on peut trouver un phosphoester, qui peut être un résidu R.

[Page 3](#)

Il existe des bactéries qui n'ont qu'une seule couche de lipides, donc on n'appelle pas forcément ça une membrane.

Stérol : cholestérol

Stérol pentocyclique : hopanoïde.

C'est une barrière sélective, on va trouver beaucoup de transporteurs, elle se situe au niveau de la membrane plasmique (enzymes de la photosynthèse, enzyme de la paroi...)

4. Les enveloppes

Ce sont les différentes structures qui entourent la membrane plasmique.

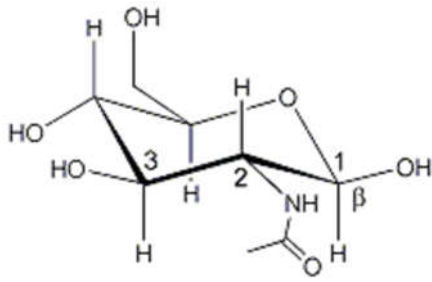
a) La paroi

La plupart des micro-organismes sont contenus dans une paroi, exception faite des mycoplasmes et de quelques archéobactéries qui ne possèdent pas de paroi.

(1) Structure de la paroi

Peptidoglycanes = mureine : c'est un enchainement d'osomines.

- N-acetyl-glucosamine :



N-acetyl glucosamine (GlcNAc)

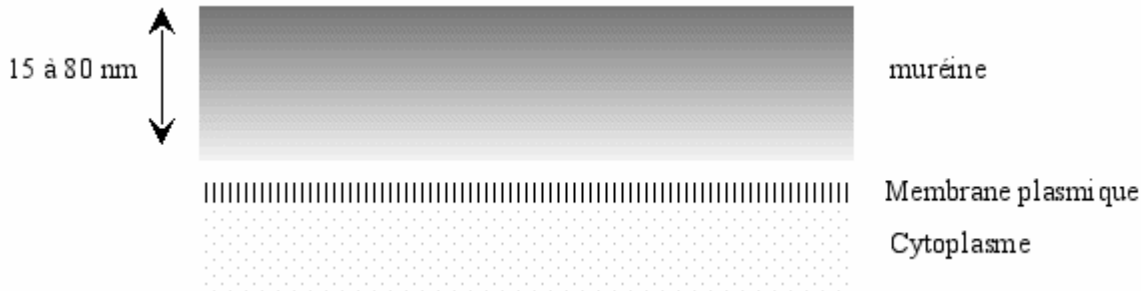
- N-acetyl muramique (N-acetyl-glucosamine qui porte un lactate sur le O).

Tetrapeptides :
 L-Ala
 L-Lys
 D-Ala acide mesodiaminopimélique
 D-Glu

Voir page 6

- **Paroi des bactéries à Gram positif**

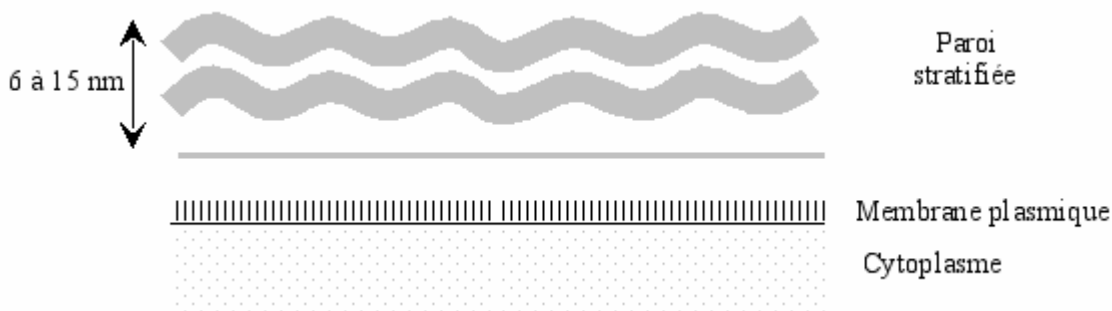
Elle est épaisse (entre 15 et 80 nm) (elle ne laisse pas passer l'éthanol), composée d'une épaisse couche de muréine ou peptidoglycane. Cette épaisse couche est traversée par des acides téichoïdes, acides téichoïques ou lipotéichoïques.



Acide téichoïque : Glycérol + rubitol phosphate

- **Paroi des bactéries à Gram négatif**

Elle est plus fine (entre 6 à 15 nm), composée de plusieurs couches dont une lipidique (Lipide de Braun ; ce qui explique que l'alcool, liposoluble, passe à travers ce type de paroi). Cette paroi est traversée par du Lipopolysaccharide (LPS) représentant l'antigène O des entérobactéries ainsi que leur toxine. Ce LPS contribuerait à échapper à la phagocytose et au complément. Elle contient une endotoxine, qui aura effet à la mort de la bactérie.



Dans les bactéries gram +, l'espace péri plasmique est dit inexistant, puisque tout petit. On ne le voit pas en microscopie.

(2) Mise en évidence de la paroi

On prend des bactéries en suspension, de type bacille, et on va faire agir des enzymes comme le lysozyme, qui est une enzyme qui agit sur le peptidoglycane, on pourrait prendre la pénicilline, antibiotique qui agit sur la paroi en fabrication. On va donc prendre le lysozyme à 37°C. On est dans un milieu isotonique, on obtient un sphéroplaste (gram -), qui maintient les bactéries, ou un protoplaste (gram +), qui provoque un éclatement des bactéries, dans le milieu hypotonique (H₂O).

(3) Rôle

Elle participe au maintien de la cellule, sa forme, sa rigidité, sa pression osmotique, elle sert de protection contre les substances toxiques, elle a un rôle antigénique, elle sert de récepteur aux bactériophages. D'un point de vue médical, les LPS qui sont toxiques sont une endotoxine, ce qui participe à la pathogénicité. Elle peut être la cible d'antibiotiques comme la pénicilline.

(4) Coloration de Gram

Voir photocopié page 7

L'étape discriminante est l'étape avec de l'éthanol (ou acétone). La coloration suivante à la fushine est une coloration pas trop forte pour qu'elle ne recolore pas par-dessus la première.

b) Capsule et glycocalix

Epaissie et visqueuse autour de la bactérie. Si elle a une structure bien définie, on parle de capsule, si elle est moins bien définie, on parle de glycocalix, de nature glucidique. Certaines capsules sont composées :

- de polymères simples
 - fructose (levane) : streptococcus salivarius (bouche)
 - Glucose (dextrane) : leuconostoc mesenteroïdes (sol, matière végétale)
- De polymère dérivés d'oses : Acides glucuronique (glucose) :
 - Streptococcus pneumoniae (tractus respiratoire)
 - Haemophilus influenza (méningite)

Cas particulier : paroi de nature peptidique : Bacillus anthracis : polymère D-glu

La synthèse est liée à des facteurs génétiques transférables, mais aussi à des facteurs environnementaux.

La visualisation

(1) Rôle

Elle va protéger contre la dessiccation, les prédateurs, les bactériophages, les substances toxiques. Elle a un caractère pathogène (expérience des souris...). Elle peut empêcher la phagocytose. Elle permet l'attachement à d'autres cellules pour les infecter. Elle permet l'attachement à différents supports :

Inerte : Streptococcus mutans (bouche, se fixe sur la dent, responsable de la plaque dentaire) Elle forme des « biofilms », qui sont des structures en 3D, organisée, laisse passer les nutriments, permet le développement.

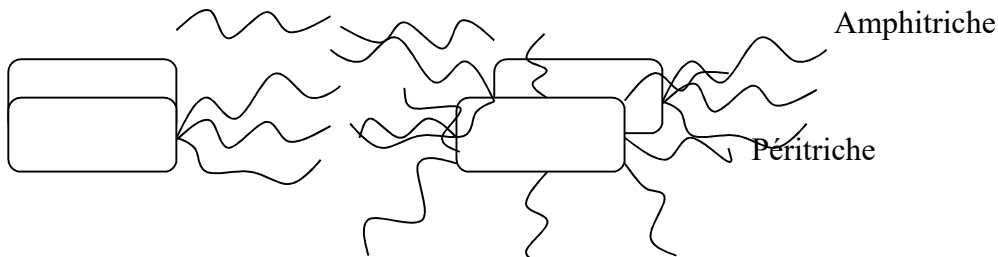
5. Les annexes

a) Les flagelles

Ce sont des appendices locomoteurs, qui interviennent dans la mobilité des bactéries. Ce sont de petites structures, le diamètre mesure 20 nm, et la longueur est de 15 à 20 µm. On ne peut les voir au microscope, mais pour les voir, on introduit des substances qui forment une gaine autour du flagelle, et on pourra ainsi le voir. Selon les bactéries, le nombre et la localisation peuvent être variables :

Monotriche

Lophotriche



Voir page 26

Succession de nage et de culbute. Le déplacement se fait en fonction de leur environnement. Ce sont des composés chimiques : le chimiotactisme. Il peut être positif, quand il attire les bactéries, associé à la nage de la bactérie, ou négatif, quand il repousse les bactéries, associé à la culbute.

Certaines bactéries peuvent être identifiées via le flagelle. En effet, la flagelline possède énormément de propriétés antigéniques. On l'appelle d'ailleurs antigène H. Chez E. Coli, on a dénombré 50 antigènes H. Par exemple, la 0₁₅₇H₇ a fait des milliers de victimes aux états unis, c'est la maladie du Hamburger.

b) Filament coaxial – endoflagelle

Il est formé d'un faisceau de fibrille. Les déplacements se traduisent par un glissement, on observe cela chez les bactéries spiralées (Spirochète, Leptospire, Treponema pallidum (Syphilis)).

c) *Pilis – Fimbriae*

Structure filamenteuse que l'on retrouve chez les bactéries Gram -, avec quelques exceptions, de bactéries Gram +. 7 nm de diamètre, 0,3 à 5 µm de long. Certains micro-organismes ont jusqu'à 1000 pilis. *E. Coli* en a une centaine. Elles servent à accrocher la bactérie à des rochers, des cellules hôtes. Les lectines accumulent des globules rouges et peuvent reconnaître spécifiquement les structures glycosylées. Les souches pathogènes d'*E. Coli* sont des entérocytes. *Nisseria gonorrhoeae* se fixe au niveau du système génito-urinaire via ces pilis. Ce sont des structures riches en protéines, qui leur confèrent de fortes propriétés antigéniques, ce qui permet d'échapper au système immunitaire.

d) *Pilis sexuels*

Ce sont de petits pilis, nombreux (1 à 10), plus épais. On peut trouver des ponts cytoplasmiques entre 2 bactéries, permettant le transfert de matériel génétique : transfert conjugatif.

e) *Les endospores*

Elles s'observent chez les Gram +, comme *Clostridium* ou *Bacillus*, et chez une seule Gram -, *Coxiella burnetti*, qui entraîne la Fièvre Q, qui est une pneumonie atypique. Elle se forme à l'intérieur d'une cellule végétative. C'est la forme de vie la plus résistante. Elle est induite en fonction du milieu, elle a des propriétés spécifiques : la résistance à la chaleur (thermo résistance), qui est certainement due à l'acide dipicolinique. Elle évite la dessiccation, elle est plus résistante aux UV, elle est insensible à de nombreux composés. L'oxyde de méthylène est actif sur l'endospore. Elles ont une localisation variable, spécifique suivant les bactéries.

Voir structures possibles sur le net

Elle permet par exemple de différencier les deux *Clostridium*. En position centrale, on la retrouve chez *Bacillus subtilis*.

Cycle sporal : voir *polycopié*

Quand l'environnement devient difficile, les endospores sont libérées. Quand les conditions redeviennent favorables, les endospores vont germer.

III. La croissance bactérienne

A. Définitions

La croissance bactérienne correspond à l'augmentation des différents constituants cellulaires, et ayant pour finalité l'augmentation du nombre de cellules.

B. Mode de reproduction des bactéries

Le mode de reproduction est caractérisé par sa simplicité, et par son caractère asexué. Il peut exister, chez les micro-organismes eucaryotes, une phase sexuée, mais elle n'est pas obligatoire, correspond à un brassage génétique. La plupart se divisent par fission (ou division) binaire, ou scissiparité. Les autres se reproduisent par bourgeonnement, on peut assister à la fragmentation, et aussi à la sporulation. Ces derniers ne sont pas majoritaires, la fission binaire est la plus répandue :

Le chromosome s'attache à la membrane (point réplicateur). L'ADN se duplique. Les deux chromosomes se détachent. La cellule se divise dans l'axe longitudinal.

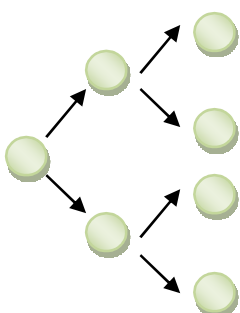
Dans certains cas, les cellules ne se détachent pas et forment des chainettes (bacilles, streptocoques). Les cellules peuvent aussi former des amas en se divisant en 2 axes, et même, par des divisions selon les 3 axes, on obtient des structures en 3D.

C. Expression mathématique de la croissance bactérienne

On va considérer 2 possibilités :

1. Une croissance exponentielle

1 bactérie en donne 2 :



Nombre de divisions	Nombre de bactéries
1	2
2	4
3	8
4	16

Si au départ on a N_0 bactéries et après n divisions on a N bactéries : $N = N_0 \times 2^n$

μ = taux de croissance = nombre de divisions par heures $\rightarrow \mu$ divisions en 1 h

t est le temps pour n divisions

$\rightarrow n$ divisions en t h

$$n = \mu \times t$$

$$N = N_0 \times 2^{\mu t}$$

2. Une vitesse de croissance

$$v = + dN / dt = k N \quad k N \text{ car c'est de premier ordre.}$$

On intègre, k qui est le taux de croissance spécifique : $N_0 \int_{t_0}^t dN / N = \int_{t_0}^t k dt \quad \ln N - \ln N_0 = k (t - t_0)$

$$t_0 = 0$$

$$\ln N - \ln N_0 = kt$$

$$\ln (N / N_0) = kt$$

$$N = N_0 \times e^{kt}$$

3. Relation entre k et μ

$$2^{\mu t} : e^{kt}$$

$$\ln 2^{\mu t} : \ln e^{kt} \quad k = \mu \ln 2$$

4. Temps de doublement par division = temps de génération τ ou G

C'est le temps que met une cellule pour se diviser, ou le temps que met une population pour doubler.

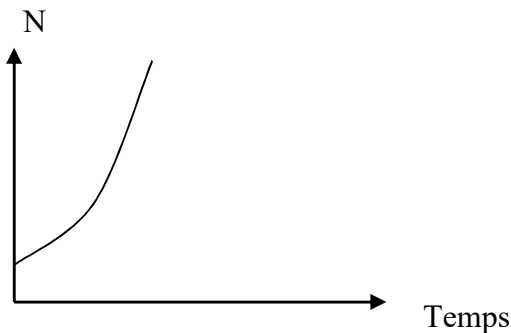
Relation entre μ et τ ? Entre k et τ ?

$$\tau = \ln 2 / k$$

$$\tau = 1 / \mu$$

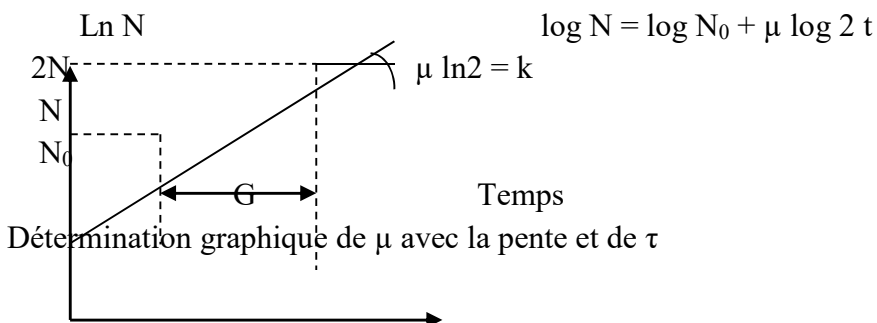
$$\mu = 1 / \tau$$

5. Représentation graphique



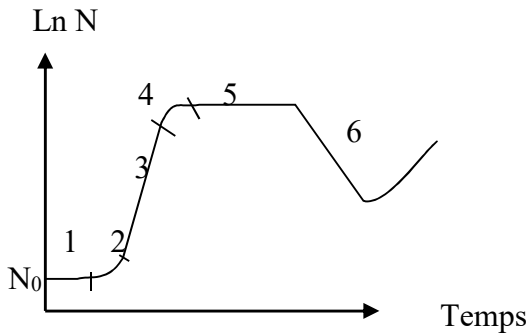
$$N = N_0 \times 2^{\mu t}$$

$$\ln N = \ln N_0 + \mu t \ln 2 = \ln N_0 + \mu \ln 2 t$$



Détermination graphique de μ avec la pente et de τ

D. Courbe expérimentale de la croissance bactérienne



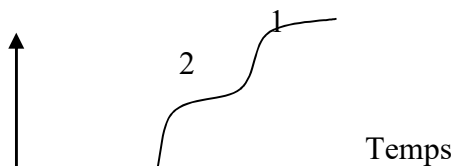
Différentes phases :

- 1) La phase de latence = phase stationnaire initiale, $\mu = 0$, c'est la phase d'adaptation de l'équipement enzymatique, elle a une durée variable suivant l'âge de la bactérie et le milieu.
- 2) Phase d'accélération : μ augmente, τ diminue
- 3) Phase exponentielle de croissance : $\mu = \mu_{\max}$. On peut, au cours de cette phase, déterminer τ .
- 4) Phase de décélération : μ diminue
- 5) Phase stationnaire : $\mu = 0$, $\tau = 0$. Des signaux métaboliques sont émis en cas de manque de nutriments. Elle émet aussi des composés toxiques, souvent fermentés, ce qui entraîne une diminution du pH, et une augmentation du taux d'alcool.
- 6) Phase de déclin : on assiste à la mort de la bactérie, et souvent à une autolyse.

E. La croissance diauxique

En milieu synthétique, sources de carbone limitante

Ln N



1	2
Glucose	Arabinose
Fructose	Inositol
Mannose	Sorbitol
Manitol	Maltose

F. Mesure de la croissance bactérienne : dénombrement

1. Milieux de culture

Tout milieu solide qui permet la croissance bactérienne, ou liquide. Tous les éléments indispensables à la croissance. Les conditions.

a) Différentes textures

- Liquide : on mettait les bactéries dans un tube à essai avec le milieu liquide. Il y a ensemencement et inoculation. Puis on met le tout dans les conditions adéquates (température, O_2 , agitation ?, temps). Puis on laisse incuber. Le milieu peut devenir trouble. Il faut donc faire attention à ce que le tube ne soit pas contaminé dès le départ. On peut aussi observer un dépôt, ou encore un voile en surface.
- Solides : permettent d'isoler des micro-organismes. Koch l'a fait le premier sur des tranches de pomme de terre. Cependant, beaucoup n'ont pas poussé car la pomme de terre manque de richesse. Donc Koch a décidé de solidifier un milieu liquide d'un de ses élèves (Loeffer), et il a essayé de gélifier le milieu en mettant de la gélatine. Mais la gélatine devient liquide avec une température un peu élevée ($37^\circ C$ environ), donc ce n'était pas la solution. Dans le même temps, la femme du Pr. Hesse gélifiait des confitures avec de l'Agar. Il a donc prit de l'Agar pour gélifier le milieu. L'agar était une substance produite par des algues rouges. C'est un polymère d'oses sulfatés. Il a un point de surfusion entre 40 et $42^\circ C$. 5 ans après, Mr Pétri a créé les boîtes de Pétri, en faisant une surfusion d'Agar et en faisant couler l'Agar dans la boîte de pétri.
- Milieux synthétique :
 - Définis : pauvre, la composition est connue exactement.
 - Non définis : milieux complet, riche, on ne connaît pas la composition exacte. On peut y trouver des peptones : hydrolysats de protéine, digestion protéolytique, soja, viande, caséine, gélatine, tryptone ; des extraits de bœuf.

b) Milieu complexe = riche

- Peptones
- Extrait de bœuf : extrait aqueux. Beaucoup d'acides aminés, des peptides, des nucléotides, des acides organiques, des vitamines et des minéraux.
- Extrait de levure : extrait aqueux. Grande source de vitamines B, mais aussi de composés azotés et carbonés. *Voir page 10*

On définit :

- Milieu de base : à utilisation générale.
- Milieu enrichi : contient des éléments pour favoriser la croissance de certains micro-organismes qui ont des exigences pour se développer. On peut par exemple mettre du sang.
- Milieu sélectif : empêche la croissance de certains micro-organismes. On peut ajouter des molécules toxiques, comme des sels biliaires, des azides de Na^+ , des ammoniums quaternaires (Cetrimide) : *Pseudomonas*, des colorants. On peut aussi apporter des molécules en concentration toxique. C'est le cas du NaCl, à 75 g.L^{-1} ne permet la croissance que des staphylocoques. On peut aussi y mettre des métabolites, comme une source de Carbone.
- Milieu électif : c'est un milieu qui favorise la croissance de certains micro-organismes.
- Milieu d'orientation : la croissance, l'aspect, les caractères biochimiques peuvent orienter vers les espèces de micro-organismes. Par exemple, le milieu Chapman est riche en NaCl, il est sélectif, et sélectionne les staphylocoques. Le Manitol vire au jaune avec des bactéries Manitol +, c'est un indicateur coloré, et on s'oriente vers *Staphylococcus aureus*. Le milieu EMB (éosine, bleu de méthylène) sélectionne les bactéries Gram -, et si l'on a des reflets métalliques, on s'oriente vers *E. coli*.
- Milieu différentiel : permet de distinguer différents groupes et même de les identifier selon certaines bases de leurs caractères biologiques. Par exemple, le milieu avec de la Gélose au sang, permet de distinguer les bactéries hémolytiques (hémolyse les globules rouges), et permet de distinguer les staphylocoques des streptocoques (gorge). Ça sert à repérer les bactéries pathogènes.
- Mac Konkey : Il permet de différencier les bactéries lactoses + des lactoses -.

2. Isolement des micro-organismes

Il existe différentes techniques d'isolement. Il peut être nécessaire pour le dénombrement, mais c'est aussi une étape importante pour l'identification.

a) Epuisements

On dépose la suspension bactérienne, et à l'aide par exemple d'une anse de platine, ou d'une pipette boutonnée. *Voir page 8.* On peut avoir des tailles variables, des formes différentes, des aspects différents (pigmentation), des surfaces différentes (rugueuse, lisse), des consistances de colonies variables (friable, mucoïdes, butyriques).

b) Par dilution

- En surface : râteau, billes, immersion.
- En profondeur *Voir Poly*

3. Méthode de dénombrement

a) Comptage direct

(1) Microscope

On compte directement au microscope. L'échantillon va être déposé entre lame et lamelle. On compte plusieurs champs, un champ fait 10 mm^3 . Aujourd'hui, on utilise des cellules spéciales avec des volumes définis. Par exemple, la cellule de Malassez, la cellule de Thomas.

100 bactéries dans 25 rectangles

Méthode finale et peu coûteuse mais laborieuse. On peut voir la morphologie des cellules.

(2) Compteurs électroniques

Pour grosses cellules, elles traversent un champ électrique, c'est une méthode fiable, mais elle compte aussi les débris.

(3) Cytomètre en flux(FACS)

Bactéries marquées au chromophore, faisceau laser croise les micro-organismes. 15 000 000 €.

(4) Méthode optique : turbidimétrie

Mesure de la densité optique : spectrophotomètre, colorimètre.

Différence entre densité optique et absorbance : Quand on mesure l'absorbance, on mesure la capacité d'une molécule à absorber l'énergie lumineuse.

b) Comptage indirect

(1) Milieu liquide

Série de dilution. On ensemence une série de tubes, on fait une incubation, et on regarde si les tubes sont positifs. On peut chercher simplement la présence d'un trouble (42°C), la présence de gaz (on met pour cela des cloches de Durham dans lesquelles du gaz se forme sous l'effet de la bactérie) ou l'utilisation de sucres (ajout d'indicateur coloré).

	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Nombre de tubes positifs	3	3	2	1	0

On obtient le nombre caractéristique 321 à 10^{-1} à partir de tables, c'est le nombre le plus probable (npp) pour le nombre de bactéries, c'est un degré de confiance variable.

On peut de plus lire 211 à 10^{-2} ou 322 à 10^{-1} . En bactériologie de l'eau, on utilise cette méthode de dénombrement. Table de Mc Grady : table en fonction du nombre de répétition dans la solution.

(2) Milieu solide

50 bactéries \rightarrow 100 μ L

X bactéries \rightarrow 1000 μ L = 1 mL

X = 500 bactéries/mL suspension diluée = $5 \cdot 10^6$ bactéries/mL en suspension initiale.

On peut faire des erreurs par défaut en ne comptant pas assez de colonies, car certaines grosses colonies recouvrent les plus petites, donc on parle souvent d'unité formatrice de colonie. Certaines produisent des composés toxiques. La solution est d'augmenter la taille des boîtes, ou d'apporter des facteurs de correction. Le principe du facteur de correction est que l'on va compter le nombre de bactéries sur la boîte, et on va définir une valeur corrigée en fonction d'un facteur correcteur k, qui va être fonction du diamètre de la boîte, des diamètres représentatifs des colonies, et on va regarder le diamètre moyen sur 20 colonies représentatives, et k va dépendre aussi de la variance.

On peut aussi faire des erreurs par excès :

10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	
252	24	3	
255	27	5	Expérimental + contamination (3 bactéries)
2550	2700	5000	réalité

Si on fait la moyenne entre les 3 valeurs, on aura une moyenne entre 3000 et 5000. Aux faibles dilutions, l'erreur est plus importante. Pour résoudre cela on va utiliser la technique des équivalents boîtes. On va considérer que l'on a toutes les boîtes en 10^{-3} .

100 boîtes à 225 bactéries à 10^{-1}

10 boîtes à 27 bactéries à 10^{-2}

1 boîte à 5 bactéries à 10^{-3}

On a un total de 111 boîtes à 10^{-3}

287 bactéries sur 111 boîtes, par boîte, 2,58 bactéries. 2,58 bactéries de moyenne à la dilution 10^{-2} . 2580 bactéries dans la solution initiale. Permet de moyenner les erreurs.

Son travail en double (222 boîtes).

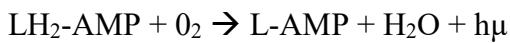
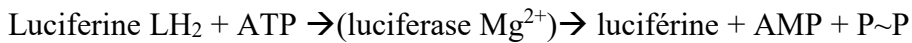
(3) Comptage sur filtre

(4) Mesure de la Biomasse

- Poids sec : On cherche la relation poids sec/nombre de bactéries
- Détermination de la quantité des constituants cellulaires
 - Quantité d'azote : % d'azote fixé \rightarrow nombre de bactéries
 - Quantité de chlorophylle

(5) Paramètre reflétant l'activité cellulaire

On peut suivre l'apparition et la disparition de certains métabolites, la composition d'O₂, de glucides, le dégagement de CO₂. On utilise des méthodes biochimiques, et on fait des dosages spectrophotométriques. Le luminomètre permet de doser le métabolisme énergétique par les photons. On regarde notamment l'ATP. Pour cela, la luciférase :



Modifications physico chimiques :

- PA
- Potentiel d'oxydo-réduction

4. Paramètres influençant la croissance bactérienne

a) Espèce

Voir tableau poly

Micro-organisme eucaryotes → Temps de génération élevé

Certaines bactéries ont un temps de régénération plus important

En général → G_{bactérie} → rapide

b) Paramètres physiochimiques

(1) Température

Thermosensibilité

Dans la nature on trouve des bactéries qui se différencient en fonction de leur température maximale de croissance.

Bactéries mésophiles : température max de croissance : 37°C.

Bactéries thermophiles : 45°C et 70°C optimale : 50-55°C.

Bactéries hyperthermophiles : 80°C : Archia.

Bactéries psychrophiles : optimale : 10-15°C. à 0°C. Présence de lipides insaturée au niveau de la membrane plasmique → fluidification de la membrane. Par exemple Pseudomonas, Alcalagines, moisissures, levures.

Psychotrophes : micro-organismes pouvant pousser à basse température mais leur maximum de croissance est celui des mésophiles (37°C).

Bactéries extrémophiles → conditions extrêmes.

On peut avoir des micro-organismes qui se développent dans des gammes étroites de température : stenotherme. On peut aussi en avoir qui se développent dans des gammes larges de température : eurytherme.

(2) pH

Chaque espèce va se développer dans une gamme de pH qui lui est propre et définie, et en général, une bactérie supporte moins de variation de pH que de variation de température.

Les bactéries acidophiles se développent dans un pH de 1 à 5, c'est le cas de la plupart des mycètes et des algues, c'est le cas notamment des bactéries lactiques, aussi dans les bactéries qui provoquent la maladie de la Pierre.

On trouve aussi les bactéries neutrophiles supportent les pH neutres.

Les bactéries alcalophiles ou basidrophiles supportent des pH de 8,5 à 11,5.

Le pH influe sur la disponibilité des nutriments. Il influence aussi l'activité des perméases (inactivé par saturation par les protons).

Inactivation d'Exoenzymes.

pH = conservation

(3) Activité de l'eau Aw

Eau libre : Aw : 1

Aw : 0 (glace) eau capable d'être échangée.

Taux d'humidité de l'eau à l'équilibre. Flux d'activité de l'eau est proche de 1, plus les bactéries peuvent se développer.

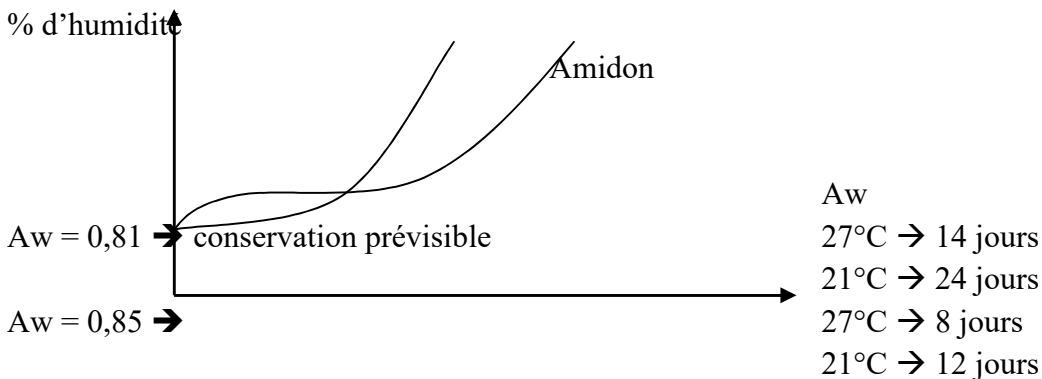
Voir page 11 poly

Micro-organisme osmophiles, allophiles.

Les bactéries qui nécessitent des pressions osmotiques élevées sont appelées osmophiles. On définit celles qui ne sont pas osmophiles mais osmotolérantes, ce sont celles qui supportent, mais n'en ont pas la nécessité.

NaCl → Halophiles ou halotolérantes.

Il n'existe pas une relation linéaire entre A_w et % d'humidité.



5. Cultures industrielles des micro-organismes

Il faut réunir les conditions optimales de croissance afin de récolter la quantité maximale de produit au meilleur coût et le plus rapidement possible. On va avoir plusieurs techniques de croissance industrielle.

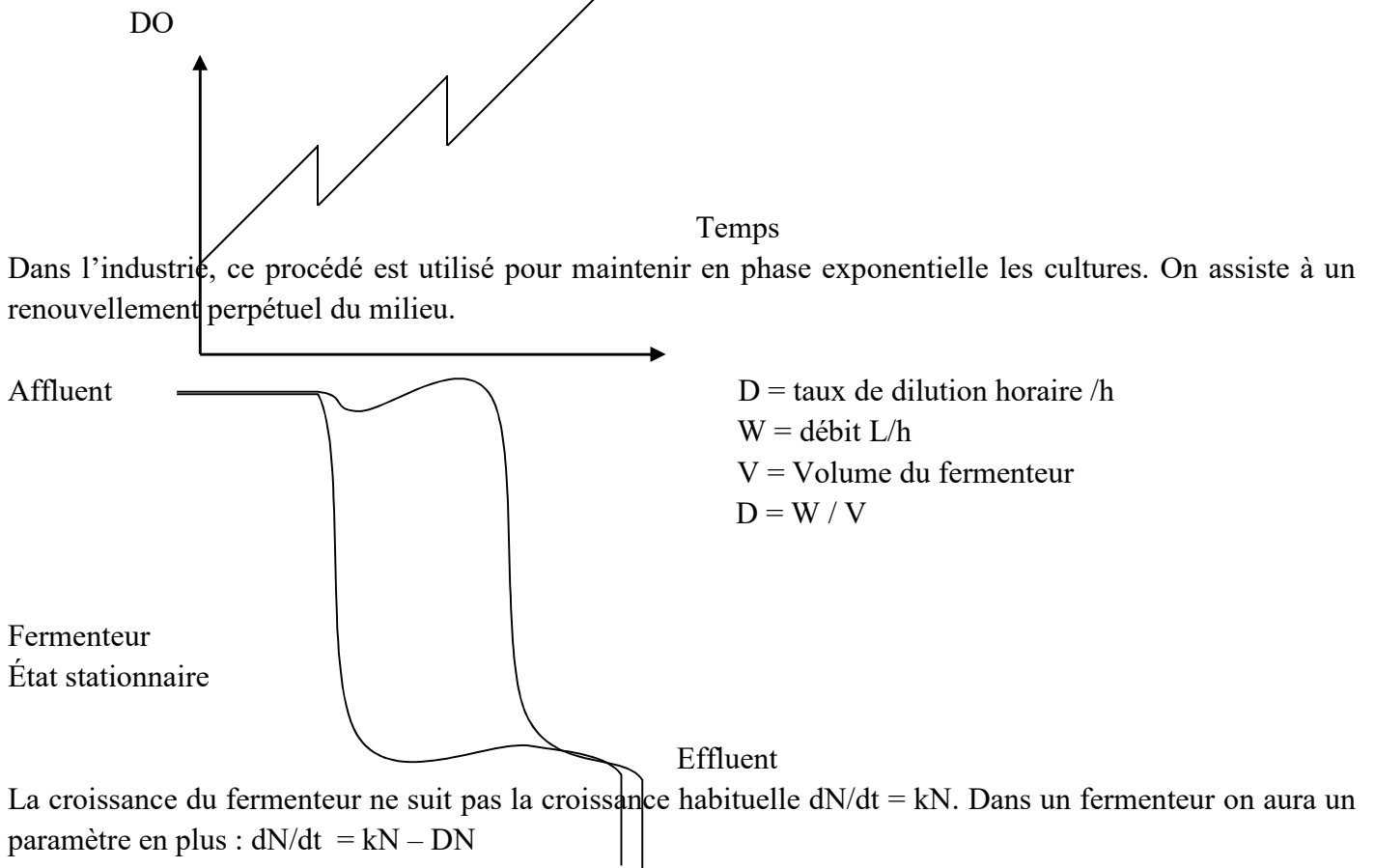
a) La culture en BATCH ou la culture discontinue

Ce type de culture est couramment utilisé dans l'industrie, en labo. Dans ce cas de culture, le milieu de culture est non renouvelé. Donc dans ces conditions, on va assister à épuisement des nutriments ou à apparition de composés toxiques. Ce procédé consiste à cultiver dans des fermenteurs (ou bioréacteurs) tout à la fois, c'est-à-dire le milieu de culture, les micro-organismes. On peut avoir des fermenteurs de quelques litres, jusqu'à 150 000 litres, 200 000 litres. Les conditions de culture doivent être contrôlées pour éviter la mort des cellules. Par exemple, on contrôle le pH, l'oxygène dissout, et donc une agitation, on contrôle aussi la température, et on ajoute aussi de l'anti-mousse pour éviter d'avoir une asphyxie du système. On fait des prélèvements réguliers pour mesurer la croissance microbienne, mais aussi la quantité de produit attendu. Si ce sont des métabolites primaires, on se place en phase exponentielle de croissance pour avoir un meilleur rendement. Si on doit produire des métabolites secondaires, qui sont souvent produites en fin de phase exponentielle, on se place en fin de phase exponentielle et début de phase stationnaire. On arrête le réacteur quand la concentration est maximale.

Les industries qui utilisent ces techniques sont les producteurs d'alcool, de butanol, d'acétone, de boissons alcoolisées, de fromage, de produits laitiers...

b) La culture continue – Croissance continue

On peut le réaliser de façon manuelle en laboratoire.



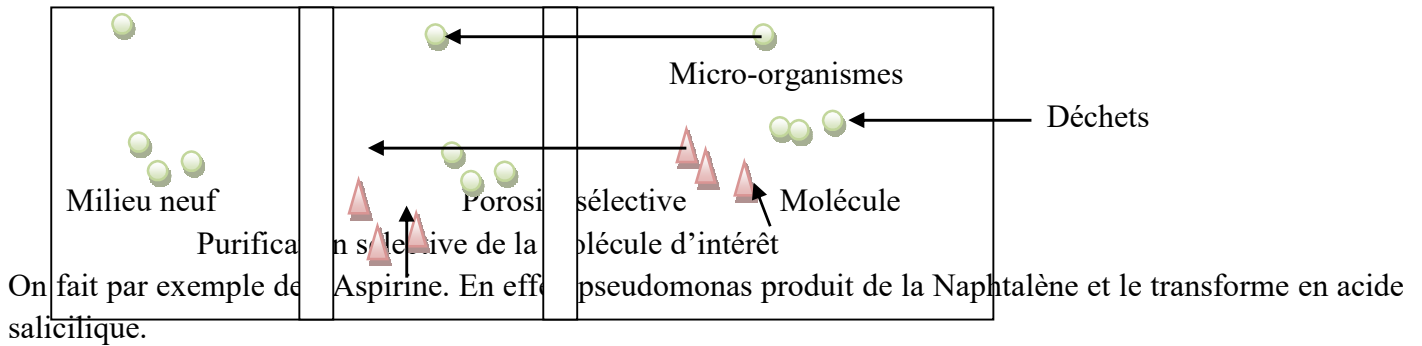
La croissance du fermenteur ne suit pas la croissance habituelle $dN/dt = kN$. Dans un fermenteur on aura un paramètre en plus : $dN/dt = kN - DN$

Dans les systèmes continus, on a 2 types de fermenteurs

(1) Les turbidostats

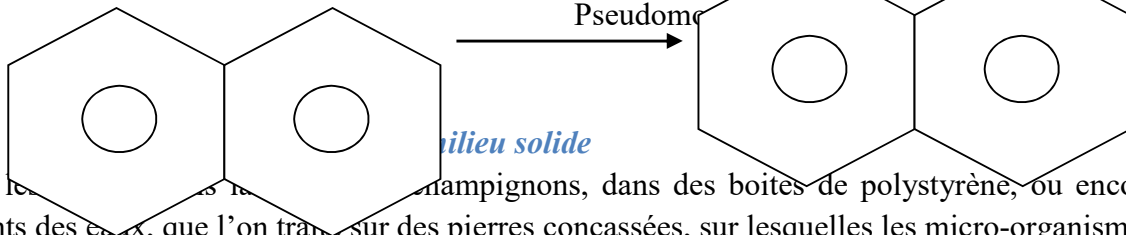
On va maintenir une quantité constante de micro-organismes, en mesurant la DO. En permanence, il y aura autant de milieu entrant que sortant.

c) Culture par dialyse



Naphtalène

Acide Salicylique



Milieu solide

On peut le faire sur des champignons, dans des boîtes de polystyrène, ou encore dans les traitements des eaux, que l'on traite sur des pierres concassées, sur lesquelles les micro-organismes se fixent, et on utilise des biofilms sur lesquels on fait des lits bactériens. L'eau passe sur le tout, et on observe une diminution de la charge en matière organique. On la retrouve aussi en production de Vinaigre. En effet, pour produire du vinaigre, on prend le support solide en copeaux de hêtre, sur lesquels on met la bactérie qui fait du vinaigre, et en haut on met du vin, qui va passer sur les copeaux, les bactéries fermentent, et à la fin on obtient du vinaigre.

Chez les eucaryotes, il existe 4 règnes : animaux, plantes, mycètes ou champignons, et protistes (eucaryotes unicellulaires). La microbiologie, c'est l'étude des micro-organismes procaryotes (bactéries) et eucaryotes qui sont répartis dans les règnes des mycètes et des protistes. On connaît 2 types de cellules : les cellules procaryotes et les cellules eucaryotes. Les cellules eucaryotes font de 10 à 100 micromètres, elles ont de nombreux organites internes faits de membranes, leur matériel génétique est enfermé dans une membrane : le noyau.

I. Les mycètes

Au sens microbiologique sont des organismes eucaryotes, porteurs de spores, dont la nutrition se fait par absorption, sont dépourvus de chlorophylle, se reproduisent de façon sexuée ou asexuée. L'étude des mycètes s'appelle la mycologie. Il y a un certain nombre de mycètes qui sont capables de produire des toxines. Par exemple : l'amanite tue mouche. Les champignons sont capables de nous poser de gros désagréments. On appelle ça des mycoses. Il y a une recrudescence des mycoses ces dernières années, à cause des maladies nosocomiales, que l'on attrape en hôpital, et aussi surtout par les malades immunodéprimés. Les patients immunodéprimés se défendent moins contre les agents extérieurs. D'autres mycètes nous sont très utiles pour la production d'antibiotiques ou de fromages. On trouve les champignons sur terre principalement. Il en existe en milieu marin et en eaux douces. Beaucoup sont pathogènes. Elles sont capables d'infecter les plantes, les animaux et l'homme, au même titre que les virus. Il y a des espèces de champignons qui ne sont pathogènes que pour l'homme, ou que pour l'animal, ou que pour les plantes. Un même champignon ne peut infecter tous les autres règnes. Il existe aussi des relations bénéfiques entre les organismes et les mycètes : les mycorhizes et les lichens.

Les mycorhizes se forment au niveau des racines des plantes, ce qui permet à la plante de couvrir plus de surface d'absorption, et au champignon de vivre. Les champignons vont participer à la dégradation des nutriments du sol, les matières organiques complexes dégradent les éléments, qui pourront être absorbés par la plante. On connaît 90 000 espèces de mycètes. On estime qu'il y en a 1,5 millions. Les racines d'environ $\frac{3}{4}$ des plantes vasculaires forment avec des mycètes des mycorhizes.

Les lichens sont une association entre mycètes et algues, ou cyanobactéries. Leur rôle est bénéfique dans le sens où les mycètes, avec les bactéries, participent à la décomposition de matières organiques complexes, et ces organismes sont donc qualifiés d'hétérotrophes. Ils forment les substances organiques simples et les molécules organiques. Ils produisent pour les autres organismes du carbone, de l'azote et du phosphate.

On utilise aussi les mycètes comme *Saccharomyces cerevisiae* pour le pain, la bière, le vin. Pour la bière, on utilise aussi *Saccharomyces carlsbergensis*, et pour le vin, *Saccharomyces ellipsoideus*. On utilise *Kluyveromyces fragilis* et *Kluyveromyces lactis* pour le fromage, *Penicillium roquefortii* pour le roquefort, *Penicillium camembertii* pour le camembert, *Candida utilis* pour les levures alimentaires, et *Penicillium notatum* pour la pénicilline.

La pénicilline permet de faire des antibiotiques bactériostatiques qui bloquent la synthèse des parois bactériennes. Elle a été découverte par Alexander Fleming en 1928, qui, parti en vacances, cultivant des *Staphylococcus aureus*, revient et trouve des *Penicillium notatum*, autour desquels il n'y avait plus de staphylocoque. Il a alors identifié ce champignon *Penicillium notatum*, comme celui qui inhibait la croissance des bactéries. Il a alors fait des études et a découvert que cette pénicilline était efficace contre beaucoup de bactéries gram +. Il a ensuite fallu l'isoler et le purifier, pour en sortir le principe actif. Ernst Chain et Howard Florey ont été prix Nobel de médecine en 1945. La structure de base de la pénicilline est une cystéine + une valine. On n'utilise pas que *Penicillium notatum*, mais aussi *Penicillium chrysogenum*. Ce sont des champignons qui poussent vite, en général, ce qui est l'une des caractéristiques très utiles pour les industriels. Les colonies sont généralement vertes, bleu-vert ou gris-vert (blanche, jaune ou rosée). Ce sont des colonies duveteuses. On en trouve partout dans le monde, et les zones tempérées sont plus propices. On les retrouve dans les sols, la cellulose (plantes, bois, papier, etc...), les aliments, les graines, etc... Il y en a aussi dans les tapis, les papiers peints, les substances organiques, dans la laine de verre. C'est un champignon cloisonné, qui

produit des conidies, parties sexuées du champignon. Elles produisent les spores reproductrices. Cette structure va nous permettre d'identifier les mycètes d'un point de vue microscopique. Elles ont les caractéristiques physiques qui nous permettent de les identifier. *Penicillium* peut causer des réactions allergiques et asthmatiques chez les individus susceptibles. *Penicillium* n'est généralement pas pathogène, sauf par exemple *Penicillium marneffei*. On le retrouve surtout en Asie du sud est et en Indonésie. Les *penicilliums* pathogènes produisent des mycotoxines. En effet, la pénicilline est toxique pour les bactéries. Par exemple, ils produisent l'Ochratoxine A (néphrotoxique, hépatotoxique, carcinogène) et la citrine (carcinogène).

L'appareil végétatif des champignons : c'est un « thalle », qui peut être unicellulaire (levures et « formes levures ») ou, le plus souvent filamenteux (« mycélium », dont la croissance est localisée aux apex). Ils n'ont pas de véritables tissus comme chez les plantes supérieures ou chez les animaux. Le thalle se compose de cellules ayant pour fonction le catabolisme et la croissance. Il varie en complexité et en taille. De la cellule microscopique unique des levures jusqu'aux moisissures multicellulaires et aux champignons macroscopiques. Chez une moisissure ou un mycète charnu (champignon macroscopique), le thalle est constitué de longs filaments de cellules reliés les uns aux autres, ces filaments sont appelés hyphes (du grec hyphe = tissu). L'hyphe va à la fois être végétatif, et devra alors nourrir le champignon, et reproducteur, et il va alors produire des spores reproductrices. La classification se fait selon plusieurs critères simples et directement observables : les filamenteux (mycélium = pluricellulaire) ou unicellulaires (type levure). Pour les champignons filamenteux, il faut savoir si le mycélium est cloisonné ou non.

La croissance des champignons est rapide, ce qui est dû à la structure du mycélium, tous les hyphes possèdent le même cytoplasme. L'augmentation de la longueur des hyphes se fait par croissance cellulaire et par divisions. Il y a une migration très rapide des constituants à travers tout le mycélium. Les champignons peuvent passer de forme mycélium (pluricellulaire) à forme levure (unicellulaire) en fonction de l'environnement. On appelle ça le dimorphisme. C'est la forme levure qui est pathogène.

Les champignons n'ont pas besoin de beaucoup de lumière pour pousser. L'humidité est un facteur très favorisant. On peut en trouver partout où il y a de la matière organique. La majorité des moisissures sont aérobies, la plupart des levures sont des anaérobies facultatifs. Ils sont Saprophytes (utilisent de la matière organique morte pour se nourrir), ils sécrètent des enzymes hydrolytiques pour digérer des substrats externes et pour absorber des produits solubilisés. Ce sont des Chimioorganohétérotrophes, ils utilisent de la matière organique comme source de carbone, d'électrons et d'énergie. Comme tous les organismes, les champignons possèdent du glycogène : polysaccharide de réserve principal des mycètes. Ils utilisent des glucides, et principalement le glucose ou le maltose, et des composés azotés pour la synthèse de leurs propres protéines. Ils doivent puiser le carbone dans les composés organiques. Ce sont des végétaux non chlorophylliens, donc ils sont incapables de photosynthèse. Ils sont donc obligatoirement : soit saprophytes, soit symbiotiques (se développant en association avec d'autres organismes avec tolérance ou bénéfice pour les 2 partenaires), soit parasites, en déterminant chez l'hôte une maladie ou mycose.

La reproduction chez les champignons est asexuée ou sexuée. La reproduction asexuée, c'est la division d'une cellule mère en 2 cellules filles, comme chez les bactéries ou les levures. Il y a bourgeonnement de la levure, formation d'une nouvelle paroi cellulaire, et séparation des 2 cellules filles. Chez les champignons, le mode de reproduction le plus courant est la production de spores : il y a d'abord une mitose, puis une division cellulaire. Elles possèdent un matériel génétique complet. Il y a 2 types de spores chez les champignons : la conidie et la sporangiospore. La conidie est produite principalement par *Aspergillus* et *Penicillium*. La sporangiospore prend naissance dans un sac ou sporange à l'extrémité de l'hyphe aérien. Le sporange peut contenir des centaines de sporangiospores. Chez *Rhizopus nigricans* (moisissure du pain), on retrouve ces sporangiospores. La reproduction sexuée se fait par une union de 2 noyaux compatibles. Certaines espèces fongiques sont auto fertilisantes, et produisent des gamètes sexuellement compatibles sur le même mycélium. On appelle cela l'homothallie. D'autres espèces requièrent un croisement entre mycéliums différents, mais compatibles sexuellement : hétérothallie.

2N (stade diploïde) → Méiose → N (stade haploïde) → fusion cytoplasmes → N+N (stade dicaryotique)

Les spores fongiques servent à l'identification des espèces de mycètes, par la taille, la forme, la couleur, le nombre de spores. Elles servent aussi à la dissémination des espèces. De plus, ce sont des formes de résistance, ce qui permet une plus grande dissémination. Une cellule de levure est capable de vivre 2 vies : une diploïde, et une haploïde dans le cas d'une sous-alimentation. Quand les conditions redeviennent bonnes, elle redevient diploïde.

La levure est une mycète unicellulaire, non filamenteuse, généralement sphérique ou ovale, elle ne possède qu'un noyau, et se reproduit soit de façon sexuée par formation de spores, soit de façon asexuée par bourgeonnement et division transversale. Elle ne possède pas de flagelle. Une cellule va pouvoir par bourgeonnement se reproduire en moyenne 24 fois. Voir schéma 1.

II. La mycologie médicale

Science qui s'occupe des maladies humaines et animales causées par des champignons. Les mycoses ou maladies parasitaires causées par des champignons, symptomatologie très variée. Les allergies fongiques cutanées et respiratoires, Les mycotoxicoses causées par l'ingestion de divers aliments envahis par les champignons. L'entrée dans l'hôte se fait par les voies naturelle (Candida, Geotrichum), par les voies accidentelles (voies cutanées, voies aériennes, voies digestives). Les mycotoxicoses dépendent de l'âge, du sexe, de la race, des tissus. Le développement d'une mycose très souvent sous la dépendance de modifications du terrain : par exemple, les modifications locales, un terrain taré, un déséquilibre hormonal, un déséquilibre de la flore bactérienne, un affaiblissement des défenses de l'organisme spontanées ou provoquées. Facteurs dépendants de l'agent pathogène : possibilité qu'a celui-ci de se satisfaire des conditions physico-chimiques de l'hôte, possibilité de prendre une forme de levure, particularité des métabolismes libérant chez l'homme des substances inhibitrices des réactions immunitaires. Exemples de mycoses systémiques : l'histoplasmosse est due à l'*Histoplasma capsulatum*, et la coccidioïdomycose due à *Coccidioïdes immitis*, deux mycoses des voies respiratoires inférieures, dues à des mycètes dimorphes. La Candidose est la mycose la plus connue, et peut-être aussi la plus fréquente, causée par *Candida albicans*, candidose vulvo-vaginite ou cutanéomuqueuse de la bouche (muguet). Sécrétion de protéases qui pourraient être à l'origine de la modification de la membrane de cellules de l'hôte de façon à permettre l'adhérence du micro-organisme. Elle atteint les nouveaux nés, les patients atteints de SIDA, et les personnes sous traitement antibiotiques à large spectre.

(Contrepétition>

Personne n'est jamais assez fort pour ce calcul = personne n'éjacule assez fort pour se calmer)

Eléments de Virologie

Virus : micro-organisme qui possède un seul type d'acide nucléique, soit de l'ADN, soit de l'ARN. Il peut être simple brin ou double brin. Son organisation est acellulaire, c'est un parasite obligatoire qui doit infecter des cellules eucaryotes ou procaryotes pour se multiplier.

Le choix de l'hôte est limité par le type de l'hôte, et le type de cellules. Un virus infecte un seul type d'hôte, et un seul type de cellules. Par exemple, un virus de plantes infecte une plante et pas un animal. Un type de cellules, signifie par exemple le foie, et pas les poumons...

Cependant, certains virus peuvent infecter plusieurs types de cellules, par exemple H₅N₁.

- Chez les bactéries : bactériophages, ex : Bactériophage T4
- Chez les plantes : ex : virus de la mosaïque du tabac
- Chez les insectes : ex : Baculovirus
- Chez les animaux : ex : virus de la grippe, virus VIH

III. Agents infectieux non conventionnels ou agents transmissibles non conventionnels : ATNC

Viroïdes, Prions

Structure encore plus simple que les virus

A. Viroïdes

Courtes chaînes d'ARN infectieux, responsables de maladies chez les plantes.

B. Prions

Particules protéiques associées à certaines maladies neurodégénératives chez l'homme et les animaux.

Prion normal (protéines à hélices α) → anormal (protéines hélices α , feuillets β , qui s'agglomèrent et forment des plaques).

IV. Classification des virus d'animaux

Première classification basée sur les préférences d'hôte de chaque virus.

Définition d'un spectre d'hôte

Mais problème : un virus peut infecter plusieurs hôtes, et un hôte peut être infecté par plusieurs virus.

La classification moderne est basée sur les caractéristiques de l'acide nucléique, sur la morphologie, sur les caractères physiques (symétrie de la capsid et la nature chimique des constituants du virion), et sur la présence ou l'absence d'enveloppe.

A. Classification basée sur les caractéristiques de l'acide nucléique

Classification par ARN ou ADN, mais aussi en fonction des stratégies de réplication des virus :

1. Virus dsDNA double strand = double brin
2. Virus ssDNA simple strand = simple brin
3. Virus dsRNA
4. Virus ssRNA brin (+) (code directement les protéines)
5. Virus ssRNA brin (-)
6. Virus RNA avec une étape de reverse transcription
7. Virus DNA avec une étape de reverse transcription

B. Classification basée sur la morphologie des virus

Tous les virus possèdent une nucléocapside composée d'un acide nucléique entouré d'une capsid protéique de structure icosaédrique, hélicoïdale complexe.

Capsid icosaédrique :

20 faces, 12 sommets, 3 axes de symétrie par rotation. Exemple caractéristique : l'adénovirus.

Capsid hélicoïdale :

Tube creux fait de protéines (protomères), l'ARN s'enroule sur lui-même, arrangement en spirale pour former un tube plus ou moins rigide. Un exemple caractéristique : le virus de la mosaïque du tabac.

Il existe des formes combinées (capsid icosaédrique + hélicoïdale). Exemple du bactériophage T4. Les protéines de la capsid sont liées entre elles de manière non covalentes, parce qu'il faut à un moment que l'acide nucléique soit libéré dans la cellule infectée.

La gradation supplémentaire est le virus nu ou le virus enveloppé.

C. Cycle infectieux typique :

1. Attachement
2. Pénétration
3. Décapsidation
4. Transcription et/ou traduction
5. Réplication
6. Assemblage
7. Re-largage

V. Quelques virus

1. Virus à ADN double brin enveloppé

Famille de Herpesviridae :

- Herpes simplex virus : bouton de fièvre chez l'homme
- Varicella-zona : varicelle chez l'homme
- Virus Epstein-Barr : mononucléose infectieuse du lymphome de Burkitt chez l'homme.

2. Virus à ADN double brin enveloppé

Famille des poxviridae : variole

3. Virus à ADN double brin nu

Famille des Adenoviridae. On les utilise pour faire de la thérapie génique.

B. Les virus à ARN

ADN → ARN brin (+) = ARN messenger → protéine

ARN viral (+) sert d'ARN génomique car c'est un brin + encapsidé pour faire l'acide nucléique du virus et il peut être directement traduit en protéines. A l'inverse un brin - sera un ARN génomique, mais ne sera pas messenger.

L'ARN + va être traduit en protéines virales. La traduction se fait dans la cellule avec la machinerie nécessaire. Cette étape là est l'étape qui marque le parasitisme obligatoire. Les capsides contiennent les protéines de la capside, et les protéases virales. Les protéases virales servent à la réplication

1. Virus à ARN simple brin (+) enveloppé

Famille des Togaviridae

- Exemple de la famille des Alphaviridae : virus du Chikungunya

2. Virus à ARN simple brin (+) enveloppé avec un intermédiaire ADN

Famille des Retroviridae

- Virus VIH chez l'homme
- Virus HTLV chez l'homme (leucémie humaine des cellules T)

C. Virus à ARN simple brin (-)

L'ARN viral sert d'ARN génomique, mais il ne peut servir d'ARN messenger. Il faut d'abord faire un ARN +. Donc à partir de l'ARN viral -, on synthétise un ARN viral + avec une ARN polymérase ARN dépendante.

1. Virus à ARN simple brin (-) enveloppé

Famille des Orthomyxoviridae :

- Virus Influenza : grippe chez l'homme chez le porc
- Virus de la grippe aviaire (virus H₅N₁)

Famille des Rhabdoviridae. Elle a une capside en forme d'obus. C'est le virus de la rage.

Famille des Adenoviridae. Virus des fièvres hémorragiques de l'homme (Lassa virus).

D. Virus à ARN double brin

On a un brin + et un brin -.

1. Virus à ARN double brin

Famille des Reoviridae : Rotavirus qui donne des diarrhées chez l'homme.

VI. Cycle du virus

A. L'attachement du virus à sa cellule cible

Chaque virus va avoir un type de récepteurs particuliers, qui va correspondre à l'anti-récepteur de la cible. C'est cette raison pour laquelle un virus des hépatites va trouver sur les hépatites les récepteurs. D'où la compatibilité pour un seul type de cellule.

L'entrée du virus se fait de différentes façons. Il peut être directement transloqué dans la cellule, ou alors il peut y avoir une étape d'endocytose, ou alors il peut y avoir fusion des membranes.

B. Multiplication d'un virus après entrée dans la cellule

Il faut qu'il y ait décapsidation, la capside se désagrège pour libérer l'acide nucléique. A partir d'un virus, la machinerie cellulaire produit un certain nombre de matériel génétique et de protéines, ce qui peut aller jusqu'à des milliers de nouveaux virions. Une fois synthétisé, le matériel se réarrange pour produire de nouveaux virions, prêts à aller infecter de nouvelles cellules.

C. Libération des virions néoformés

Soit la cellule est lysée, c'est souvent ce qu'il se passe dans le cas des virus nus, ou alors on aura un bourgeonnement à la surface de la membrane, et création de l'enveloppe à partir de la membrane, dans le cas des virus enveloppés.

Décontamination et agents antimicrobiens

Contrôle de la croissance bactérienne

I. Définitions

A. Décontamination

C'est la réduction de la population microbienne à des niveaux considérés sans dommages pour l'homme, niveaux définis par des normes de santé publique.

L'APNOR est l'agence française de la normalisation. Ses objectifs de décontamination peuvent être atteints de différentes façons.

1. Inhibition

L'inhibition empêche la réplication.

2. Destruction de la population

La destruction de la population empêche la réplication de l'ADN de façon irréversible.

3. Elimination

L'élimination permet d'éliminer de façon physique le micro-organisme.

B. Désinfection

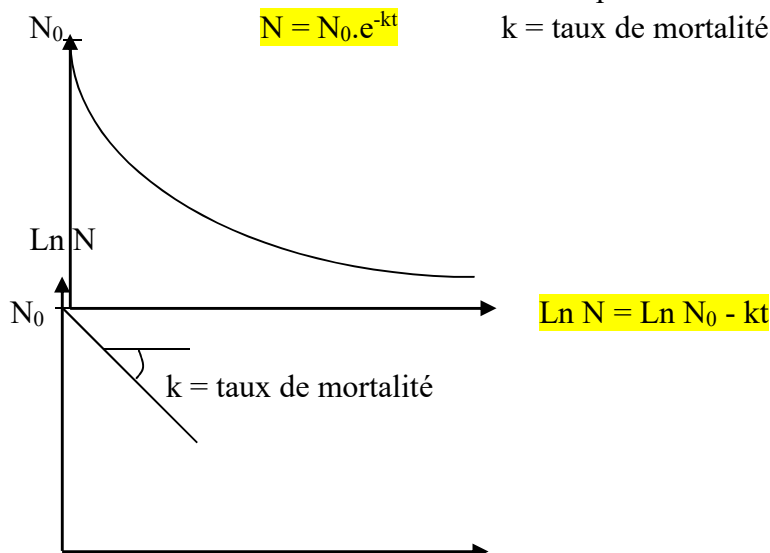
Elimination des micro-organismes potentiellement pathogènes. On peut utiliser des désinfectants, utilisés sur les objets, ou des antiseptiques, employés sur les tissus, mais moins efficaces que les désinfectants, et moins toxiques.

C. Stérilisation (De *stérilus* : infécond)

Procédé qui consiste à détruire d'un objet ou d'un habitat toute cellule vivante, spore, virus... C'est une idée absolue qui n'est jamais atteinte car la mort des bactéries est un phénomène statistique.

II. Expression mathématique : destruction des micro-organismes

Tous les micro-organismes ne meurent pas en même temps. La mort n'est pas instantanée, les micro-organismes meurent en suivant une décroissance exponentielle.



Pour analyser la mortalité des micro-organismes, on a recours à des notions particulières :

- D = Coefficient de réduction décimale (ou cela peut être un coefficient thermique de RD). C'est le temps nécessaire pour réduire la population au dixième de ce qu'elle était (pour tuer 90% de la population). On doit noter à quelle température le D correspond ($D_{17,5^\circ\text{C}}$), à quelle radioactivité...

Temps ($D_1 = 1 \text{ minute}$)	Survivants	Tués
0	10^5	0
1	10^4	$9 \cdot 10^4$
2	10^3	$9 \cdot 10^3$

3	10^2	$9 \cdot 10^2$
4	10^1	$9 \cdot 10^1$
5	1	9
6	10^{-1}	9,9
7	10^{-2}	9,99

III. Facteurs influençant l'activité antibactérienne

A. Différents procédés pour réduire les populations microbiennes

1. Différents procédés

a) Par la chaleur

(1) La stérilisation

- Clostridium botulinum

$$\text{Log } N/N_0 = 12$$

$$D_{121^\circ\text{C}} = 12 \text{ s} = 0,2 \text{ min} \quad t = 2,4 \text{ min}$$

- Clostridium sporogenes

$$\text{Log } N/N_0 = -5$$

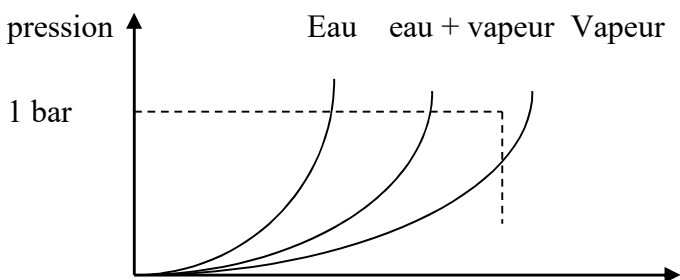
$$D_{121^\circ\text{C}} = 100 \text{ s} \quad t = 8,3 \text{ min}$$

(2) La chaleur sèche

Très lente, inutilisable pour du matériel thermosensible (180°C pendant 30 minutes ou $160\text{-}170^\circ\text{C}$ pendant 2 à 4 h). Réalisé en four Pasteur (= Poupinelle = étuve).

(3) Chaleur humide

Se fait en autoclave, en cocotte minute.



On peut utiliser les autoclaves sans autorisation s'ils font moins de 20L. On la fait pendant 20 minutes à 121°C . On peut aussi la faire 30 minutes à 110°C . On voit que l'on stérilise mieux en chaleur humide qu'en chaleur sèche. L'eau favorise la décontamination.

(a) Adhésif

Marron → humide

Noir → sèche

(b) Dans l'industrie

On prend des petits tubes de verre qui renferment des spores de bactéries très résistantes, souvent de Stéerothermophilus, et à la fin, on va voir si ces spores sont capables de pousser. Si elles ne poussent pas, c'est que la stérilisation s'est bien passée. Ce sont des CPA 7679.

(4) Technique UHT

Stérilisation à ultra haute température sur un temps très court. Cette technique va éviter d'altérer les produits et les vitamines. On l'utilise par exemple pour le lait.

(5) La Thyndallisation

On l'appelle aussi stérilisation fractionnée à la vapeur, utilisée aussi avec des matières thermosensibles. On chauffe plusieurs fois à des températures peu élevées, en faisant des incubations à 37°C entre les stérilisations. On la fait par exemple à $90\text{-}100^\circ\text{C}$ pendant 30 minutes, ce qui tue les cellules végétatives, mais conserve les spores. Alors on les met en culture à 37°C pour faire germer les spores, qui deviennent des cellules végétatives, que l'on remet alors à 100°C , et on refait ça jusqu'à élimination complète.

(6) La pasteurisation

C'est le traitement des substances par un chauffage contrôlé à la température bien inférieure à la température d'ébullition. C'est une méthode qui ne stérilise pas, elle vise à tuer les pathogènes pour l'homme. Elle permet notamment de détruire la flore pathogène des bacilles Gram -.

Cette technique n'est pas assez longue pour détruire des Gram + comme Staphylococcus ou Streptococcus. Ceci ralentit la dégradation des produits. On la fait 20 minutes à 65°C.

(7) La flash-pasteurisation

Elle durera 15 secondes à 72°C. Sur la population globale, la législation impose des réductions globales de $\log N/N_0 = -34$. Si l'on fait le calcul, en partant à 10^7 bactéries/L, on arrive à 10^{-27} bactéries/L.

(8) La thermisation

C'est une technique douce pour faire diminuer la flore totale. On la met quelques secondes à 60°C.

b) Par rayonnement

On utilise différents procédés de rayonnements électromagnétiques. On les fait souvent à 260nm, ce qui crée des dimères de thymine et inhibe la réplication. On peut aussi faire des rayonnements aux absorbances des acides aminés, pour détruire le tryptophane, et tuer la cellule.

(1) Les UV

On utilise aussi des UV, mais leur efficacité est réduite, par le grand nombre de zone d'ombres, et ça produit de l'ozone, toxique.

En France, on n'utilise pas les UV pour décontaminer en industrie, mais pour des pièces... En Asie, on les utilise pour le traitement de l'eau.

En industrie pharmaceutique et cosmétique on s'en sert pour remplir des flacons de façon stérile.

(2) Les IR

Les infra rouges induisent une agitation, et donc une augmentation de la température, ce qui rejoint la technique par chauffage.

(3) Les micro-ondes

Très peu utilisé, sauf pour certains sirops, car peu efficace.

(4) Les rayonnements ionisants

Ce sont les rayonnements radioactifs β , γ , et les rayons X. Ça fait perdre les électrons, et former des ions.

Tous les produits peuvent être décontaminés par ce type de procédé, mais il faut des autorisations spéciales.

S'exprime en Gray : D

Micrococcus radiodurans $D^* = 4 \text{ kGray}$

Clostridium botulinum $D^* = 2,6 \text{ kGray}$

2. Technique physique

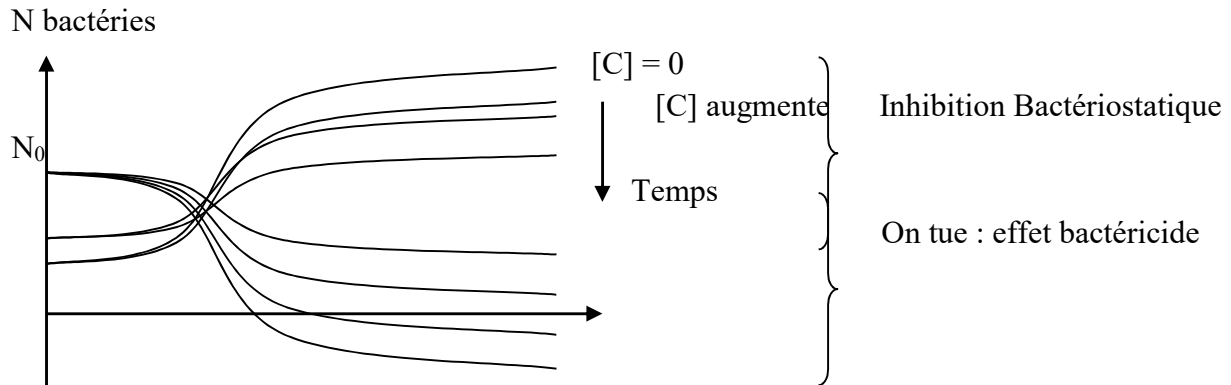
a) Filtration

Ne stérilise pas, mais enlève les micro-organismes. On utilise de l'amiante, du coton, de la laine de verre...

On utilise des HEPA (filtre de haute efficacité) de 2 types : flux verticaux ou horizontaux. Aujourd'hui on utilise les PSM (poste sécurité microbiologique) : les 3 P : protège le manipulateur, l'environnement, et l'échantillon.

B. Utilisation d'agents chimiques : Anti Bactériens

Les composés chimiques ont des modes d'action divers et variés, mais on va pouvoir suivre leur mode d'action en regardant l'effet sur la population.

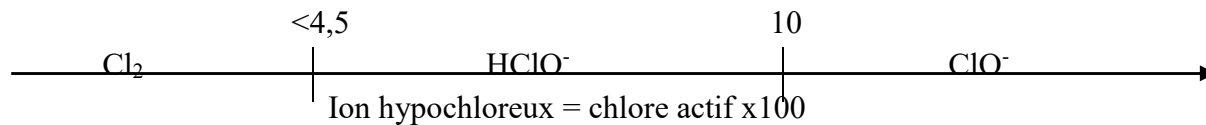


Concentration minimale inhibitrice : CMI

Concentration minimale bactéricide : CMB

(Voir photo)

Chlore : Chloration : moyen le plus efficace pour le traitement final des eaux de consommation. C'est aussi le traitement de choix des eaux de distribution, traitées avec cette molécule. De façon générale, les bactéries sont plus ou moins fortement résistantes, le chlore n'agit pas sur les spores, mais sur les formes végétatives. Les virus sont modérément résistants, les protozoaires sont très résistants, particulièrement quand ils sont enkystés. Plusieurs formes actives de chlore plus ou moins efficace. D'abord, le chlore moléculaire, ensuite l'ion hypochlorite de sodium ou de calcium (NaClO^- : eau de javel), et l'ion hypochloreux HClO^- .



Voir page 21

Le chlore dans la piscine devient du chlore libre et du chlore combiné. Le chlore libre est du chlore actif et du chlore potentiel. Le chlore combiné a un faible pouvoir désinfectant, et donne un goût désagréable. Il faut donc doser la matière organique.

IV. Chimiothérapie anti bactérienne → les antibiotiques

A. Généralités

1909 – Paul Ehrlich

Activité anti microbienne.

Ces molécules doivent permettre le traitement de maladies infectieuses, et la molécule doit être nuisible pour les micro-organismes pathogènes mais inoffensive pour la cellule.

Fleming

B. Définition

Walksman : 1943

A découvert substance chimique produite par micro-organisme capable d'inhiber le développement de détruire des bactéries et d'autres micro-organismes.

Turpin et Velu, en 1957

Tout produit chimique produit par un être vivant ou élaboré par synthèse avec un coefficient chimio thérapeutique élevé, et dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible concentration, et ceci de façon spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux à l'égard des virus, des micro-organismes ou même de certains êtres pluricellulaires.

C. Classification

Elle peut se faire suivant différents critères :

1. **Origine**
2. **Structure chimique**
3. **Mode d'action**

- Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne : précurseurs, transfert des précurseurs, insertion
- Inhibition de la synthèse de la membrane cytoplasmique
- Inhibition de la synthèse de l'ADN
- Inhibition de la synthèse protéique 50S ou 30S
- Autres mécanismes, antiaérobies et antimétabolites

4. **Effet cellulaire**

Effet bactéricide, bactériostatique.

CMI, CMB.

Il existe différentes techniques :

- Dilution en milieu liquide
- Dilution en milieu solide
- Diffusion en milieu solide
- E-test

D. **Antibiogramme et spectre thérapeutique**

Le but est de déterminer le type de réaction vis-à-vis d'un antibiotique. On a vu en TP que l'on détermine si les bactéries sont sensibles (probabilité de succès thérapeutique acceptable en utilisant les voies classiques d'administration de l'antibiotique) ou résistantes (forte probabilité d'échec thérapeutique). Il y a aussi les intermédiaires pour lesquels le succès thérapeutique est imprévisible. Ces bactéries forment un ensemble hétérogène dans lequel la CMI ne permet pas de prédire un succès thérapeutique.

Un antibiogramme ne sera pas obligatoirement effectué en fonction du micro-organisme. Ça va dépendre de la classe thérapeutique à laquelle il appartient. Elle est fonction du spectre clinique de l'antibiotique.

E. **Resistance aux antibiotiques**

Une résistance clinique rejoint un échec thérapeutique.

Penicilline G (1942) Staphylocoque dorés (1943)

Meticilline G (1961) 1962

Ampiciline (1962) Entérobactéries (1964)

Cephalosporine (1980) 1981

1. **Différents types de résistance**

Résistance naturelle

Résistance acquise : mécanisme de résistance pour une souche habituellement sensible

Résistance clinique : expression de la résistance in vivo, qui ne se traduit pas l'échec thérapeutique

Résistance chromosomique : liée aux chromosomes, souvent acquise.

Résistance extra-chromosomique : plasmides avec gènes de résistance, transposants

2. **Résistance transmise par différents procédés**

a) **Transformation**

Griffith → St. Pneumonsa (Capsule)

ADN en solution dans une bactérie

Etat de compétence

Bacillus, streptococcus, staphylococcus, Neisseria, Acinetobacter et Haemophilus.

b) **Conjugaison**

Transfert d'ADN de bactérie à bactérie par contact :

- Gram - : pilus sexuels
- Gram + : molécules de surface.

c) **Transduction**

Transfert de matériel génétique via un bactériophage, c'est-à-dire par un virus bactérien.

**F. 3. Mécanismes de résistance
(Notions) métabolisme bactérien**

- 1. Principe métabolique**
- 2. Besoins nutritionnels**
- 3. Besoins énergétiques**

a) *Chimique : donneur e^- , H^+ , $S \rightarrow$ chimiotrophes*

(1) Composé organique : organotrophe

Donneur d' e^- , H^+ .

Glucides

(2) Donneurs d'électrons, d' H^+ : composé minéral inorganique : lithotropes

Correction exam

200 colonies à dilution 10^{-4}

100 μL / boîte

Nombre de micro-organismes par mL ?

$2 \cdot 10^7$ b/mL

Vol plaie : 2 $\text{cm}^3 \rightarrow 24\text{h}$

$N_0 = 2 \times 2 \cdot 10^7$ bactéries.

$G = 60$ minutes à $20^\circ\text{C} \rightarrow 1\text{h} \rightarrow \mu = 1\text{h}^{-1}$

$N = N_0 \cdot 2^{\mu t}$

Dose létale 10^6 germes/kg

Individu de 56 kg.

$56 \cdot 10^6$ bactéries $5,6 \cdot 10^7$ bactéries

$N = N_0 \cdot 2^{\mu t}$

$56 \cdot 10^7 = 4 \cdot 10^7 \cdot 2^{1 \times t}$

$t = 0,485$ heures

Contamination

$N_0 = 10^8$ germes

$10^{-12} = N$

$D_{121} = 2$ minutes

$N = N_0 \cdot 10^{-t/D}$

$10^{-12} = 10^8 \cdot 10^{-t/2}$

$t = 40$ minutes

110°C

$Z = 10^\circ\text{C}$

$t = t^* \cdot 10^{-(T-T^*)/Z}$

$t = 40 \cdot 10^{-(110-121)/10}$

$t = 503,57$ minutes = 8 heures 23 minutes

$N_0 = 2 \cdot 10^{10}$ bactéries

$N = 2 \cdot 10^4 \times 10^6 / 10^{-1}$

$N = 2 \cdot 10^{19}$ bactéries

$N = N_0 \cdot 2^{\mu t}$

$2 \cdot 10^{19} = 2 \cdot 10^{10} \cdot 2^{\mu \times 10 \times 60}$

$\mu = 0,049 \text{ .mn}^{-1}$

$G = 20$ minutes

$$99,9\% \rightarrow 0,1\%$$

$$N = 10^{-3}$$

$$N_0 = 2 \cdot 10^{19} \text{ bactéries}$$

$$N = N_0 \cdot 10^{-t/D}$$

$$10^{-3} = 2 \cdot 10^{19} \cdot 10^{-t/3}$$

$$t = 7,43 \text{ minutes}$$

$$115^\circ\text{C}$$

$$z = 10^\circ\text{C}$$

$$t = t^* \cdot 10^{-(T-T^*)/z}$$

$$t = 7,43 \cdot 10^{-(115-121)/10}$$

$$t_{115^\circ\text{C}} = 29,56 \text{ minutes}$$